

JP04/014828

19.10.2004

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 1-1 NOV 2004

WIPO  
PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年10月10日

出願番号  
Application Number: 特願2003-352937  
[ST. 10/C]: [JP2003-352937]

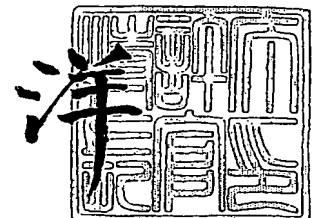
出願人  
Applicant(s): 独立行政法人産業技術総合研究所

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1 (a) OR (b)

2004年 9月27日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2004-3086249

【書類名】 特許願  
【整理番号】 341-02845  
【あて先】 特許庁長官殿  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所  
                        つくばセンター内  
    【氏名】 巖倉 正寛  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所  
                        つくばセンター内  
    【氏名】 広田 潔憲  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所  
                        つくばセンター内  
    【氏名】 曾田 裕行  
【特許出願人】  
    【識別番号】 301021533  
    【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所  
    【代表者】 吉川 弘之  
    【電話番号】 029-861-3280  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

抗体分子に結合能を有するタンパク質もしくはペプチドのカルボキシ末端がリンカー配列を介して、1級アミノ基を有する不溶性担体とアミド結合で固定化されていることを特徴とする抗体アフィニティ担体。

**【請求項 2】**

1級アミノ基を有する不溶性固定化担体が、一級アミノ基を繰り返し構造中に有するポリマー化合物を含む不溶性担体であることを特徴とする、請求項 1 に記載の抗体アフィニティ担体。

**【請求項 3】**

一級アミノ基を繰り返し構造中に有するポリマー化合物がポリアリーールアミンであることを特徴とする請求項 2 に記載の抗体アフィニティ担体。

**【請求項 4】**

一級アミノ基を繰り返し構造中に有するポリマー化合物が、ポリリジンであることを特徴とする、請求項 2 に記載の抗体アフィニティ担体。

**【請求項 5】**

抗体分子に結合能を有するタンパク質が、配列表の配列番号 1～4 のいずれかに示される群から選ばれたアミノ酸配列を有することを特徴とする、請求項 1～4 のいずれかに記載の抗体アフィニティ担体。

**【請求項 6】**

以下の一般式 (1)



で表されることを特徴とする請求項 1 に記載の抗体アフィニティ担体。

[上記式中、R<sub>1</sub>は、抗体分子に結合能を有するタンパク質もしくはペプチドのアミノ酸配列、R<sub>2</sub>は任意のリンカー配列のアミノ酸配列、Yは任意の固定化担体を表す]

**【請求項 7】**

一般式 (1) の CO-NH-R<sub>2</sub>-CO で示される部分が、  
一般式 (4)



で表されることを特徴とする、請求項 6 に記載の抗体アフィニティ担体。

[上記式中、mは自然数を示す。]

**【請求項 8】**

一般式 (1) の定義中、抗体分子に結合能を有するタンパク質のアミノ酸配列が 配列表の配列番号 1～4 のいずれかに示されるものである請求項 6 に記載の抗体アフィニティ担体

**【請求項 9】**

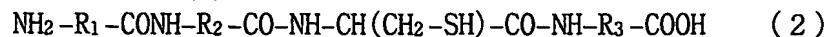
請求項 1～9 のいずれかに記載の抗体アフィニティ担体からなる、抗体精製用担体。

**【請求項 10】**

請求項 1～8 のいずれかに記載の抗体精製用アフィニティ担体を用いることを特徴とする抗体分子の分離精製方法。

**【請求項 11】**

以下の一般式 (2)



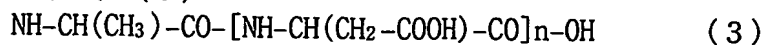
で表されることを特徴とする改変抗体結合タンパク質。

[上記式中、R<sub>1</sub>は、抗体分子に結合能を有するタンパク質もしくはペプチドのアミノ酸配列、R<sub>2</sub>は任意のリンカー配列のアミノ酸配列、R<sub>3</sub>は中性付近で強く負に荷電し、且つ NH<sub>2</sub>-R<sub>1</sub>-CONH-R<sub>2</sub>-CO-NH-CH(CH<sub>2</sub>-SH)-CO-NH-R<sub>3</sub>-COOH の等電点を酸性にし得るアミノ酸配列を表す。]

**【請求項 12】**

の一般式 (2) の NH-R<sub>3</sub>-COOH で示される部分が

一般式 (3)



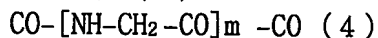
で表されることを特徴とする、請求項 11 に記載の改変抗体結合タンパク質。

[上記式中、nは自然数を示す。]

【請求項 13】

一般式 (2) の  $\text{CO-NH-R}_2\text{-CO}$  で示される部分が、

一般式 (4)



で表されることを特徴とする請求項 11 に記載の改変抗体結合タンパク質。

[上記式中、mは自然数を示す。]

【請求項 14】

一般式 (2) の定義中、抗体分子に結合能を有するタンパク質のアミノ酸配列が 配列表の配列番号 1～4 のいずれかに示されるものである請求項 11 に記載の改変抗体結合タンパク質。

【書類名】明細書

【発明の名称】抗体アフィニティ担体

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体に対して特異的な親和性を有するタンパク質を固定化した担体、該固定化に用いる改変抗体結合タンパク質、及び該固定化担体を用いて抗体を分離精製する方法等に関する。

【背景技術】

【0002】

抗体分子は、その抗原たる特定分子に対する高い選択的結合性を有するために、その優れた特徴を応用した生化学的試料中の特定分子の検出手法は、実験室のみならず臨床検査用途にも広く用いられてきた。また、抗体分子そのものを医薬製剤として用いる医療的応用も盛んに試みられており、生物由来の分子の中では際だって有用性の高い分子として学術的および産業的に広く普及している。

このような抗体分子は、抗原を投与されたヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ等の実験動物の血液中に産生され、採取された血液中より血清画分を精製することで得られる。また、1970年代に開発されたモノクローナル抗体製造技術は、生体外に確立された抗体産生細胞を培養することで継続的に抗体分子を生産させることを可能にした。この産業上有用な抗体分子の生産手法においては、得られた培養液から精製することによって抗体分子を得ている。

【0003】

抗体の精製方法としては、上述の実験動物血液由来の場合血清試料から、あるいは抗体産生細胞由来の場合培養上清液から、混在する多量の非目的生体分子の中から効率よく目的の抗体分子のみを純化させる手法が要求されるが、主に液体クロマトグラフィー法がその分離能の高さと優れた操作性、ならびに目的分子への非侵襲性から多く用いられる。上述したように抗体分子を分子の特異的検出手段として用いる場合には抗体分子そのものの純度が重要で、さらに抗体分子を医用目的に応用する場合には、残存混入物の存在は薬効の低下を引き起こすのみならず時に毒性を伴う場合も多いことから極めて深刻な問題と考えられている。液体クロマトグラフィー法は、担体と呼ばれる不溶性微粒子固体をカラムに充填し、液体試料をその担体充填層に通液させることにより試料中分子を担体表面と相互作用させて分離を図る手法であるが、その担体表面の物理的・化学的性状の違いにより、目的抗体分子の荷電に従って分離を行うイオン交換クロマトグラフィーや、疎水性の差異を利用する疎水性クロマトグラフィーや、分子量の違いに基づいて分離を行うゲル濾過クロマトグラフィーが古くから実用化されており、当初、抗体分子の精製手段として用いられた。」

【0004】

しかしながら、これらの手法による場合、満足な精製度（純度）が得られるような操作条件を見出すことが困難であり、精製工程を完成させるためには数段の異なるカラム操作を組み合わせる必要があった。

このような古典的なクロマトグラフィー法の困難さを克服し、一段のクロマトグラフィー操作により高精製度が達成できる手法として登場したのが、アフィニティクロマトグラフィーである。アフィニティクロマトグラフィーでは、目的分子に対して特異的な結合能を有する分子が被結合リガンドとして選ばれ、担体表面に配される。このリガンドは目的分子にのみ強く結合する性質を備えているので、試料を通液させて担体表面と相互作用させれば、目的分子のみが表面に捕捉されて他の非目的分子は素通りする。捕捉された目的分子はその後溶離操作により回収されるが、このような厳密な分子識別により古典的なクロマトグラフィーに比べて格段に優れた精製度が達成できる。リガンドとして利用が図られた分子としては、目的分子が抗原である場合の抗体分子、糖蛋白質である場合のレクチン（糖結合性蛋白質）、酵素に対する基質アナログ、その他特定蛋白質への結合性が確認されている低分子化合物（色素・ハプテン・阻害分子）など様々な例が報告されている。

## 【0005】

アフィニティクロマトグラフィーの抗体分子の精製法に対する応用は、これまで実用上の大きな需要にもかかわらず技術的困難さがつきまといっていたため、当然速やかに検討された。これを可能にしたのが、プロテインAに代表される天然の抗体分子結合性蛋白質の発見である（非特許文献1参照）。

プロテインAは黄色ブドウ球菌（*Staphyrococcus aureus*）に細胞壁成分として存在する蛋白質であり、抗体分子のFc（不変）領域に強い結合性をもつ。抗原との結合に関与するFab（可変）領域と異なり、Fc領域には様々な抗体分子のクラス・サブクラスを超えた共通構造が保存されており、プロテインAは抗原性の異なる様々な抗体分子に共通して用いることができる抗体結合性分子として、アフィニティクロマトグラフィーにおけるリガンドとしての応用が図られた。すなわち、蛋白質であるプロテインAを担体表面に固定化し、目的抗体分子を含む試料溶液との相互作用を図ることにより、精製を達成する手法である（特許文献1参照）。

## 【0006】

アフィニティクロマトグラフィーにおける理想の担体は、1）クロマトグラフィー操作中あるいは保存中に担体上のリガンド分子が安定に保持されること、2）目的分子への高い単位担体体積あたりの吸着容量を有すること、の2つの性能を併せ有するものであるといえる。上記1）の性能は主にその担体を用いたアフィニティクロマトグラフィーの操作上の再現性や、使用溶液や設定温度等の操作条件を左右するもので、2）の性能はアフィニティクロマトグラフィー担体そのものの性能を決定付け、精製工程の生産性や経済性を左右する産業上極めて重要な因子である。また、例えば1）の性能の欠如、すなわちリガンド分子の結合不安定性が、2）の性能の低下、すなわちリガンドの脱落による実効吸着容量の経時的減少を引き起こす場合など、上記2つの性能は相互に影響しあう因子でもある。

## 【0007】

プロテインAをリガンドとして用いるアフィニティクロマトグラフィーをみた場合、先の特許文献1では、これらのうち、特に1）の性能に配慮して、臭化シアン（CNBr）にて活性化したアガロース製担体にプロテインA分子を作用させることにより、リガンドを強固な共有結合にて結合させている。これ以前の固定化蛋白質が蛋白質自身の荷電等による物理吸着法にて結合を達成していたことからみれば、この方法では格段に安定な結合状態を提供できる点で有用であった。反面、この方法では固定化されるプロテインA中に散存する一級アミノ基との結合を利用するため、担体とプロテインA間の結合部位を制御することはできず、固定化されたプロテインAの担体上での配向はランダムとなるために結合活性に必須の部位が溶媒側に露出しない。あるいはその部位そのものが結合に供されてしまうことが生じ、結合したプロテインA量に対する見掛けの活性が低下する問題点を抱えていた。また、

## 【0008】

プロテインA分子中の一級アミノ基は複数であり、このためプロテインAが多点的に結合することで構造的な制限が生じ、蛋白質が失活してしまう問題も指摘されていた。すなわち、上記特許文献1に示される発明は1）の性能に配慮したものであるが、2）の性能に関しては大きな問題を抱えていた。ところで、プロテインAを利用したアフィニティクロマトグラフィーは、先にも述べたとおり、医薬品として極めて重要な抗体分子を効率よく精製できる技術として、工業上重要な技術であるが、そのような工業的応用の観点からみた場合に、先の1）及び2）の性能以外の重要な性能がある。それは、生産される抗体分子の医用上の安全を確保するため担体自体が定められた殺菌・洗浄工程に定期的にも供されなければならない、殺菌・洗浄工程で用いられる物理的・化学的条件に耐えうる担体であることである。適合しない担体でも利用可能であるが、その場合頻繁に新品の担体への交換が義務づけられるため、経済的に著しく非効率になる。この発明において採用されている臭化シアン法により生じる共有結合（イソウレア結合）は、通常のプロテインA・アフィニティクロマトグラフィーの操作条件で用いられる中性あるいは酸性の溶液条件下で

はほぼ問題がないものの、担体の殺菌・洗浄に通常用いられるアルカリ性溶液の存在下で解裂し、リガンドの脱離を生じてしまうために、特にプロテインAを利用した医薬品（抗体医薬）製造工程などでは必須の殺菌・洗浄工程での操作条件に著しい制限を与えた。その点においてこの発明は1)の性能において大きな進歩を与えた反面、工業上の大きな問題を積み残していた。

#### 【0009】

上記のような問題を解決するための方策として、ジスルフィド結合を利用する手法、およびチオエーテル結合を利用する手法も提案されている（特許文献2、3参照）。これらはいずれも遺伝子組み換え技術の進歩により蛋白質中の任意のアミノ酸配列を改変できるようになったことを応用し、プロテインA分子のカルボキシ末端にシステイン残基を人工的に挿入し、そのシステイン残基の側鎖であるスルフヒドリル（SH）基を特異的に利用して、プロテインAを共有結合により一点にて担体に固定化する手法である。前者においては担体側にスルフヒドリル基を表面露出している標品（例えばアクティブエーテッド・チオール・セファロース4B、ファルマシア・ファインケミカルズ製）を選び、リコンビナント型プロテインAと担体双方のスルフヒドリル基の縮合反応によりジスルフィド結合を形成させて部位特異的固定化を達成する。また後者では、アガロースのような糖高分子担体をエピクロロヒドリンのような活性エポキシ基導入試薬で予め活性化しておき、リコンビナント型プロテインAのスルフヒドリル基との間でチオエーテル結合を形成させて部位特異的固定化を達成する。いずれの方法でもプロテインAをカルボキシ末端の一点で均一に固定できることから、共有結合による結合安定性を担保し、プロテインAの結合部位を保存したまま分子の配向を揃えることができる利点がある。

#### 【0010】

従ってこの方法によれば、完全に均一に配向制御された形でプロテインAを担体に固定化できるために、固定化されたプロテインA分子のほとんどは活性型であり、先の2)の性能、すなわち、作製したプロテインA・アフィニティクロマトグラフィー担体の抗体分子の吸着量は著しく改善した。また、配向均一性が保たれることで、固定化されたプロテインA分子の変性の可逆性を高めることも可能となった。しかしながら、システイン残基の側鎖であるスルフヒドリル基を利用したジスルフィド結合およびチオエーテル結合はともに、先のイソウレア結合よりは若干耐性が向上しているものの、アルカリ性溶液の存在下で解裂してリガンドの脱離を生じてしまうために、殺菌・洗浄工程での大きな問題は残されていた。

#### 【0011】

【特許文献1】米国特許第3995018号明細書

【特許文献2】米国特許5084559号（特開昭63-267281号公報）

【特許文献3】、米国特許6399750号（特表2000-500649号公報）

【非特許文献1】Forsgren, A. and Sjöquist, J.: J. Immunol. (1966) 97, 822-827

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0012】

本発明者らは、これまでに開発された配向均一性を保つことを特徴する抗体分子の吸着量の高い担体である上記プロテインA・アフィニティクロマトグラフィー担体などに代表される抗体精製用アフィニティ担体の問題である結合安定性、またそれに由来する殺菌・

洗浄工程に関する問題を解決すること、更に、より高い抗体分子の吸着量を達成することがより効率の良い抗体分子の精製プロセスを実現するために重要な問題であると考え、これらの問題点の解消を本発明の目的とした。

【課題を解決するための手段】

【0013】

上記問題点の解決において、鋭意検討の結果、次の3つの観点から問題点の解決を図った。

その第1は、プロテインA等の抗体分子に結合能を有するタンパク質の固定化において、これまでに用いられている側鎖を利用した反応ではなく、より安定な、主鎖を介したアミド（ペプチド）結合による固定化反応を利用することである。

【0014】

蛋白質の主鎖を介した新規な固定化反応に関しては、本発明者により、既にシアノシステイン残基を介したアミド結合形成反応を利用した、蛋白質のカルボキシ末端のカルボキシル基を、一級アミンを有する担体とペプチド（アミド）結合を解して固定化する方法が開発されている（特許第3047020号公報，特開平10-45798号公報，特願2003-106825号）。この方法によれば、固定化担体の表面密度が従来法の2倍近くまで向上することが期待でき、かつペプチド（アミド）結合という極めて安定な結合によりカルボキシ末端の主鎖カルボキシル基にて蛋白質を配向固定できるために、実効上の高い活性を維持しつつ種々の物理的・化学的処理に対して高い耐性を有した担体の実現できる。

【0015】

その第2は、固定化反応に用いられる抗体分子に結合能を有するタンパク質を固定化反応に適合するように改良することである。

上記、シアノシステイン残基を介したアミド結合形成反応を適用するためには、対象とするタンパク質のカルボキシ末端側に適切なリンカーとシステイン残基および固定化反応を効率化させるための配列の導入が不可欠である。

プロテインA等天然由来の抗体分子に結合能を有するタンパク質は繰り返し配列を有すると共に分子量的にも数万以上の高分子であり、変性-再生の可逆性を保証することが困難であり、殺菌・洗浄工程においてオートクレーブとか強い変性剤等の使用が制限されることなどから、上記目的には配列の改変が不可欠である。

【0016】

この点に関し、本発明者は、鋭意検討の結果、繰り返し構造の1つの単位を用いても抗体分子に結合能を有すること（B. Nilsson, et al., Protein Eng., 1, 107-113 (1987) 参照）、繰り返し単位を2つにすると結合力は約2倍に向上するが、更に繰り返し単位を増やしても結合力の向上に目立った効果が表れないこと（C. Ljungquist, et al., Eur. J. Biochem., 186, 557-561 (1989) 参照）に着目して、繰り返し単位1もしくは2の配列を固定化することで上記問題が解消できるものと考え、配列の改変を行った。その結果、上記目的が達成できることを見いだした。

【0017】

第3に、固定化反応には、不溶性担体に一級アミンを利用するが、より多量の抗体結合タンパク質を配向制御結合させるためには、不溶性担体上の1級アミノ基の含量を高めることが重要であると考え、このことを実現するために、1級アミノ基を有するポリマー化合物 $(\text{NH}_2\text{-X})_n$ を、不溶性担体に導入しこれを利用することを検討した。その結果、抗体分子に結合能を有するタンパク質をより多量に固定化できるアフィニティ担体の作製が実現できること、また、このことにより高い抗体吸着能力を実現できることを見いだした。

【0018】

以上の3つの観点からの検討を行ったことにより、本発明において提起した上記問題点を完全に解消できることが明らかになり、本発明を完成させたものである。

【0019】

すなわち、本発明は以下の構成を伴うものである。



〔1〕 抗体分子に結合能を有するタンパク質もしくはペプチドのカルボキシ末端がリンカー配列を介して、1級アミノ基を有する不溶性担体とアミド結合で固定化されていることを特徴とする抗体アフィニティ担体。

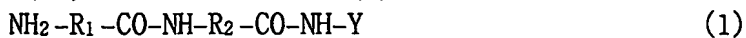
〔2〕 1級アミノ基を有する不溶性固定化担体が、一級アミノ基を繰り返し構造中に有するポリマー化合物を含む不溶性担体であることを特徴とする、上記〔1〕に記載の抗体アフィニティ担体。

〔3〕 一級アミノ基を繰り返し構造中に有するポリマー化合物がポリアリールアミンであることを特徴とする上記〔2〕に記載の抗体アフィニティ担体。

〔4〕 一級アミノ基を繰り返し構造中に有するポリマー化合物が、ポリリジンであることを特徴とする、上記〔2〕に記載の抗体アフィニティ担体。

〔5〕 抗体分子に結合能を有するタンパク質が、配列表の配列番号1～4のいずれかに示される群から選ばれたアミノ酸配列を有することを特徴とする、上記〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の抗体アフィニティ担体。

〔6〕 以下の一般式 (1)



で表されることを特徴とする請求項1に記載の抗体アフィニティ担体。

[上記式中、 $\text{R}_1$ は、抗体分子に結合能を有するタンパク質もしくはペプチドのアミノ酸配列、 $\text{R}_2$ は任意のリンカー配列のアミノ酸配列、 $\text{Y}$ は任意の固定化担体を表す]

〔7〕 一般式 (1) の $\text{CO-NH-R}_2\text{-CO}$ で示される部分が、  
一般式 (4)



で表されることを特徴とする、上記〔6〕に記載の抗体アフィニティ担体。

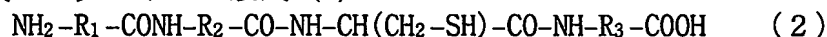
[上記式中、 $m$ は自然数を示す。]

〔8〕 一般式 (1) の定義中、抗体分子に結合能を有するタンパク質のアミノ酸配列が配列表の配列番号1～4のいずれかに示されるものである上記〔6〕に記載の抗体アフィニティ担体

〔9〕 上記〔1〕～〔8〕のいずれか記載の抗体アフィニティ担体からなる、抗体精製用担体。

〔10〕 上記〔1〕～〔8〕のいずれかに記載の抗体精製用アフィニティ担体を用いることを特徴とする抗体分子の分離精製方法。

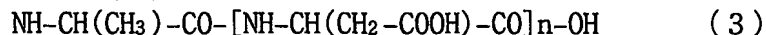
〔11〕 以下の一般式 (2)



で表されることを特徴とする改変抗体結合タンパク質。

[上記式中、 $\text{R}_1$ は、抗体分子に結合能を有するタンパク質もしくはペプチドのアミノ酸配列、 $\text{R}_2$ は任意のリンカー配列のアミノ酸配列、 $\text{R}_3$ は中性付近で強く負に荷電し、且つ $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CONH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-R}_3\text{-COOH}$ の等電点を酸性にし得るアミノ酸配列を表す。]

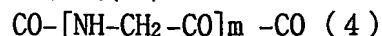
〔12〕 の一般式 (2) の $\text{NH-R}_3\text{-COOH}$ で示される部分が  
一般式 (3)



で表されることを特徴とする、上記〔11〕に記載の改変抗体結合タンパク質。

[上記式中、 $n$ は自然数を示す。]

〔13〕 一般式 (2) の $\text{CO-NH-R}_2\text{-CO}$ で示される部分が、  
一般式 (4)



で表されることを特徴とする上記〔11〕に記載の改変抗体結合タンパク質。

[上記式中、 $m$ は自然数を示す。]

〔14〕 一般式 (2) の定義中、抗体分子に結合能を有するタンパク質のアミノ酸配列が配列表の配列番号1～4のいずれかに示されるものである上記〔11〕に記載の改変抗体結合タンパク質。

## 【発明の効果】

## 【0020】

本発明により作製された、改変プロテインAを固定化した担体は、市販されている抗体吸着用担体よりも多量（約2倍）の抗体分子を特異的に吸着することが可能である。このことにより、同担体を用いた精製プロセスでは極めて優れた工程効率ならびに経済性を実現できる。また、極めて化学・物理的に安定なアミド結合を介して改変プロテインAと担体間の結合が形成されているために、抗体医薬のような薬剤製造工程に適用する場合に重要かつ望ましい条件の殺菌・洗浄工程（高温附加や強アルカリ処理）に耐えうる担体を提供できる。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0021】

本発明は、抗体分子に結合能を有するタンパク質もしくはペプチドを適当なリンカー配列を介して、1級アミノ基を有する不溶性担体とアミド（ペプチド）結合で強固に結合した抗体精製用アフィニティ担体を提供する。

本発明において、固定化に供される抗体分子に結合能を有するタンパク質もしくはペプチドであればどのようなものでも適用可能である。また、担体として利用される不溶性担体に関しても、1級アミノ基を有する不溶性担体であればよく、担体の種類には限定されない。

## 【0022】

## 1. 固定化に供される不溶性担体

本発明に用いられる、1級アミノ基を有する不溶性担体としては、一級アミノ基を有する不溶性担体であれば何でも用いることができる。一級アミノ基を有する市販の担体としては、アミノセルロファイン（生化学工業で販売）、AF-アミノトヨパール（TOSOHで販売）、EAH-セファロース4B及びリジン-セファロース4B（アマシャムバイオサイエンスで販売）、ポラス20NH（ベーリンガーマンハイムで販売）などがある。また、一級アミノ基を有するシラン化合物（例えば、3-アミノプロピルメトキシシランなど）を用いてガラスビーズなどに一級アミノ基を導入し、利用することも可能である。

## 【0023】

更に、担体単位体積当たりの一級アミノ基の含量を増大させる方法として、一級アミノ基を繰り返し単位に有するポリマー化合物を不溶性担体に導入することにより達成できる（特願2003-106825参照）。

例えば、一級アミノ基を繰り返し単位に有するポリマー化合物を不溶性担体に導入した担体としては、ポリアリルアミンをグラフトしたセルロファインが知られている（参考論文：Ung-Jin Kim, Shigenori Kuga, Journal of Chromatography A, 946, 283-289 (2002)参照）。また、CNBr活性化セファロースFF、NHS活性化セファロースFF、化学的に一級アミノ基と反応性を有する担体が知られており、これにポリアリルアミンなどの一級アミノ基を繰り返し単位に有するポリマー化合物を作用させることにより、ポリマー化合物が担体に共有結合により結合した担体を作製できる。その際、一級アミノ基を繰り返し単位に有するポリマー化合物と活性化担体との混合比と適度に調製することにより、作製される担体における、固定化反応に利用できる一級アミノ基の含量を変化させることができる。

## 【0024】

一方、ポリマー化合物としては、一級アミノ基を有し、それ以外の部分が、固定化されるタンパク質に実質的に不活性なものであれば用いることができる。市販のポリマー化合物としては、ポリアリルアミン、ポリL-リジン等が利用可能である。従って、固定化担体の種類により、本発明は特に限定されない。

## 【0025】

## 2. 抗体分子に結合能を有するタンパク質

本発明において固定化に供されるタンパク質もしくはペプチドとしては、抗体分子に対して結合能を有するものであればいずれのものでもよい。

抗体分子に結合能を有するタンパク質としては、*Staphylococcus aureus* 由来のプロテイン A (A. Forsgren and J. Sjöquist, *J. Immunol.* (1966) 97, 822-827. に記載)、*Streptococcus sp. Group C/G* 由来のプロテイン G (EP0131142A2 (1983) に記載)、*Preptostreptococcus magnus* 由来のプロテイン L (US5965390 (1992) に記載)、group A *Streptococcus* 由来のプロテイン H (US5180810 (1993) に記載)、*Haemophilus influenzae* 由来のプロテイン D (US6025484 (1990) に記載)、*Streptococcus* AP4 由来のプロテイン Arp (Protein Arp 4) (US5210183 (1987) に記載)、group C *Streptococcus* 由来の Streptococcal FcRc (US4900660 (1985) に記載)、group A streptococcus, Type II strain 由来のタンパク質 (US5556944 (1991) に記載)、Human Colonic Mucosal Epithelial Cell 由来のタンパク質 (US6271362 (1994) に記載)、*Staphylococcus aureus*, strain 8325-4 由来のタンパク質 (US6548639 (1997) に記載)、*Pseudomonas maltophilia* 由来のタンパク質 (US5245016 (1991) に記載) 等が知られている。

### 【0026】

また、これらのタンパク質に関しては、多くの場合繰り返し配列を持ち、断片化したタンパク質においても抗体分子との結合能を有することが明らかにされている。本発明が対象とする抗体分子に結合能を有するタンパク質もしくはペプチドとしては、これら天然由来の抗体結合タンパク質、部分タンパク質、その配列改変タンパク質、部分ペプチド、その模倣ペプチド、抗体分子に結合能を有する人工ペプチドなどが上げられる。このような抗体分子に結合能を有するタンパク質は、以下の一般式 (6) で表される。



[上記式中、R<sub>1</sub> は、抗体分子に結合能を有するタンパク質もしくはペプチドのアミノ酸配列を表す。]

なお、本発明において、一般式の定義においてアミノ酸配列というとき、末端アミノ基及び末端カルボキシル基を除いたものをいう。

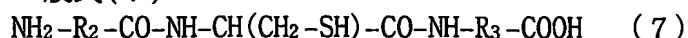
### 【0027】

本発明では、一般式 (6) NH<sub>2</sub>-R<sub>1</sub>-COOH で示される結合能を有するタンパク質もしくはペプチドを固定化できるようにするために、一般式 (2) NH<sub>2</sub>-R<sub>1</sub>-CO-NH-R<sub>2</sub>-CO-NH-CH(CH<sub>2</sub>-SH)-CO-NH-R<sub>3</sub>-COOH で示される固定化用のタンパク質を作製する必要がある。これらの一般式中、R<sub>3</sub> は、中性付近で強く負に荷電し、且つ NH<sub>2</sub>-R<sub>1</sub>-CO-NH-R<sub>2</sub>-CO-NH-CH(CH<sub>2</sub>-SH)-CO-NH-R<sub>3</sub>-COOH の等電点を酸性にできる任意のアミノ酸残基の連鎖を表す。R<sub>1</sub> は、上述の抗体分子に結合能を有するタンパク質もしくはペプチドのアミノ酸配列である。R<sub>2</sub> は、上記一般式 (1) で示される固定化しようとするタンパク質と担体との間のリンカーペプチドのアミノ酸配列を表す。R<sub>2</sub> のアミノ酸配列は任意でありその種類、数ともに限られないが、例えば Gly-Gly-Gly-Gly 等を用いることができる。

### 【0028】

このような融合タンパク質は、上記一般式 (6) で示されるタンパク質をコードする遺伝子と

一般式 (7)



[上記式中、R<sub>2</sub> および R<sub>3</sub> は上記の意味を有する。]

で示されるペプチド配列をコードする遺伝子とを結合することにより、一般式(2)  $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CO-NH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-R}_3\text{-COOH}$ で示される融合タンパク質をコードする遺伝子を作製し、これを大腸菌などの宿主生物で発現させ、その後、発現したタンパク質を分離精製することにより得ることができる。このような融合タンパク質は公知技術(例えば、M. Iwakura et al., J. Biochem. 111, 37-45 (1992)参照)を利用することにより、実施することができる。あるいは、上記融合タンパク質は、遺伝子工学的手法と慣用のタンパク質合成技術との組み合わせ、または、蛋白合成技術のみによっても作製することができる。

#### 【0029】

上記一般式(2)および(7)における $\text{R}_3$ としては、アスパラギン酸やグルタミン酸を多く含む配列が好適である。好ましくは、上記一般式(2)の物質の等電点を4から5の間の値になるように、アスパラギン酸やグルタミン酸を多く含む配列をデザインすればよい。そのような配列のうち好適な列としてアラニル-ポリアスパラギン酸をあげることができる。シアノシステイン残基の次のアミノ酸残基をアラニンにすることにより、シアノシステイン残基を介したアミド結合形成反応が生じやすいことと、アミノ酸側鎖の中でアスパラギン酸のカルボキシル基が最も酸性であるからである。

#### 【0030】

上記のことを更に具体的に示すための、Staphylococcus aureus由来のプロテインAを例に以下に説明する。

Staphylococcus aureus由来のプロテインAは、アミノ酸配列が著しく類似したA, B, C, D, Eと名付けられた5つのドメインとそれに付随した配列により構成されている。それらの各々のドメインは、57アミノ酸で構成されるが、それぞれ単独でも安定な構造をとり、例えば大腸菌において大量発現させることができる。また、各ドメインは、単独で抗体分子との結合能を発揮できる。その結合の強さは、天然由来のプロテインA全体部分よりも弱まるが、ドメインを2つ連結したものでは、天然由来のプロテインA全体部分とほぼ同程度である。

#### 【0031】

抗体分子精製用アフィニティ担体を考えれば、余分な配列はできるだけ少なくした方が、組み換え体の作製の簡便化、経済性、結合安定性の制御、殺菌・洗浄工程に関する問題の解消の寄与することが大である。そこで、プロテインAのドメインに着目して、単独ドメイン(これをモノマーと称する)とドメインを2つつなげたもの(これをダイマーと称する)の2種類について、固定化に供するための配列を設計した。

#### 【0032】

配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列は、プロテインAのAドメインモノマーを固定化反応に供するために作製された固定化用タンパク質のアミノ酸配列を表す。同配列番号2で示されるアミノ酸配列は、プロテインAのAドメインダイマーを固定化反応に供するために作製された固定化用タンパク質のアミノ酸配列を示す。

配列番号1; 固定化用タンパク質(Aドメインモノマー+リンカー(下線部))

Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro  
Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln  
Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Gly Gly  
Gly Gly Cys Ala Asp Asp Asp Asp Asp

#### 【0033】

配列番号2; 固定化用タンパク質(Aドメインダイマー+リンカー(下線部))

Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro  
Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln  
Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp  
Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu  
Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala

Asn Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Gly Gly Gly Gly  
Cys Ala Asp Asp Asp Asp Asp Asp

## 【0034】

上記配列番号1、2の配列は、以下の配列番号3及び4に示される、プロテインAのAドメインモノマー配列及びプロテインAのAドメインダイマー配列のカルボキシ末端側に、配列番号5に示す、ポリグリシン-システイン残基-アラニン残基-ポリアスパラギン酸の配列を付加した配列である。

## 配列番号3；Aドメインモノマー

Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro  
 Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln  
 Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys

## 配列番号4；Aドメインダイマー

Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro  
 Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln  
 Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp  
 Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu  
 Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala  
 Asn Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Gly Gly Gly Gly  
 Cys Ala Asp Asp Asp Asp Asp Asp

## 【0035】

## 配列番号5；リンカー

Gly Gly Gly Gly Cys Ala Asp Asp Asp Asp Asp Asp

上記配列番号5においては、リンカー部分の配列として、4個のグリシン残基を示しているが、リンカー配列に関しては任意であり、その長さもしくは種類には限定されない。システイン残基は、側鎖のSH基をシアノ化することにより、シアノシステインにし、固定化反応に利用するために必須な残基である。これに引き続くアラニン-ポリアスパラギン酸の配列は、固定化反応を促進し反応効率を高めるために導入した配列であり、配列番号1及び配列番号2に示すタンパク質の等電点を4から5の間の値になるようにできる配列であればどのような配列でも良い。

## 【0036】

配列番号表1及び配列番号2に示すタンパク質は、化学合成技術を用いても作製できるが、これらタンパク質のアミノ酸配列をコードするDNAを大腸菌などの宿主で発現させ、発現細胞から分離精製することにより得られる。

配列番号1及び配列番号2に示すタンパク質をコードするDNAの塩基配列として、それぞれ配列表6及び配列表7に示す塩基配列があげることができる。

## 【0037】

配列番号6；配列番号1の固定化用タンパク質をコードするDNA

ATGGCTGATAACAATTTCAACAAAGAACAACAAATGCTTTCTATGAAATCTTGAATATGCCTAACTTAAACGAAGAACA  
ACGCAATGGTTTCATCCAAAGCTTAAAGATGACCCAAGCCAAAGTGCTAACCTATTGTCAGAAGCTAAAAAGTTAAATG  
AATCTCAAGCACCGAAAGGTGGCGGTGGCTGCGTGATGACGATGACGATGACTAA

配列番号7；配列番号2の固定化用タンパク質をコードするDNA

ATGGCTGATAACAATTTCAACAAAGAACAACAAATGCTTTCTATGAAATCTTGAATATGCCTAACTTAAACGAAGAACA  
ACGCAATGGTTTCATCCAAAGCTTAAAGATGACCCAAGCCAAAGTGCTAACCTATTGTCAGAAGCTAAAAAGTTAAATG  
AATCTCAAGCACCGAAAGCTGATAACAATTTCAACAAAGAACAACAAATGCTTTCTATGAAATCTTGAATATGCCTAAC  
TAAACGAAGAACAACGCAATGGTTTCATCCAAAGCTTAAAGATGACCCAAGCCAAAGTGCTAACCTATTGTCAGAAGC  
TAAAAAGTTAAATGAATCTCAAGCACCGAAAGGTGGCGGTGGCTGCGTGATGACGATGACGATGACTAA

## 【0038】

なお、これらの塩基配列は、開始コドンであるATGと終止コドンであるTAAをそれぞれ5'末端と3'末端に加えた配列を示している。

アミノ酸をコードする塩基配列は縮退しており、複数のコドンがある1つのアミノ酸残基に対応することから、配列番号1及び配列番号2に示すタンパク質をコードする配列は、配列番号6表6及び配列番号7に限定されず、可能なコドンの組み合わせの数だけ存在する。

配列番号1及び配列番号2に示すタンパク質をコードする遺伝子配列を大腸菌などの宿主細胞において発現させるためには、遺伝子の転写及び翻訳に必要な配列（下線部）をタンパク質をコードする配列の上流に付け加える必要がある。その様な配列を付け加えて、ベクターに導入できるようにした遺伝子配列として、例えば、配列番号8及び配列番号9に示す配列がある。

## 【0039】

配列番号8；ベクター導入用DNA（配列番号6のDNAに対応）

GGATCCTTGACAATATCTTAACTATCTGTTATAATATATTGACCAGGTTAACTAACTAAGCAGCAAAAGGAGGAACGACT  
ATGGCTGATAACAATTTCAACAAAGAACAACAAAATGCTTTCTATGAAATCTTGAATATGCCTAACTTAAACGAAGAACA  
ACGCAATGGTTTCATCCAAAGCTTAAAGATGACCCAAGCCAAAGTGCTAACCTATTGTCAGAAGCTAAAAAGTTAAATG  
AATCTCAAGCACCGAAAGGTGGCGGTGGCTGCGCTGATGACGATGACGATGACTAAGAATTC

## 【0040】

配列番号9；ベクター導入用DNA（配列番号7のDNAに対応）

GGATCCTTGACAATATCTTAACTATCTGTTATAATATATTGACCAGGTTAACTAACTAAGCAGCAAAAGGAGGAACGACT  
ATGGCTGATAACAATTTCAACAAAGAACAACAAAATGCTTTCTATGAAATCTTGAATATGCCTAACTTAAACGAAGAACA  
ACGCAATGGTTTCATCCAAAGCTTAAAGATGACCCAAGCCAAAGTGCTAACCTATTGTCAGAAGCTAAAAAGTTAAATG  
AATCTCAAGCACCGAAAGCTGATAACAATTTCAACAAAGAACAACAAAATGCTTTCTATGAAATCTTGAATATGCCTAAC  
TAAACGAAGAACAACGCAATGGTTTCATCCAAAGCTTAAAGATGACCCAAGCCAAAGTGCTAACCTATTGTCAGAAGC  
TAAAAAGTTAAATGAATCTCAAGCACCGAAAGGTGGCGGTGGCTGCGCTGATGACGATGACGATGACTAAGAATTC

## 【0041】

配列番号8及び配列番号9に示す配列は、それぞれ配列番号6及び7に示す配列に

配列番号10

TTGACAATATCTTAACTATCTGTTATAATATATTGACCAGGTTAACTAACTAAGCAGCAAAAGGAGGAACGACT

に示す配列を開始コドンの上流に結合させると共に、5'末端に制限酵素BamHIの認識切断配列（GGATCC）、及び、3'末端に制限酵素EcoRIの認識切断配列（GAATTC）を結合させ、ベクターDNAに導入できるようにした配列である。

配列番号8及び配列番号9に示す配列は、いくつかの断片を化学合成した後、PCR法もしくはDNAリガーゼなどの酵素を用いることにより、人工合成することができる。

## 【0042】

このようにして得られた合成遺伝子を、制限酵素部位を利用し、適切なベクターに組み込み、これを宿主細胞中で発現させる。ベクターとしては、適切な制限酵素部位が利用できるものであれば、どのようなものでも利用できる。例えば、市販品のベクターとしては、pUC系、PBR系の高コピー数ベクターが好適である。配列番号6及び配列番号7を導入した組み換え体を発現させることにより、例えば、大腸菌においては、菌体タンパク質の5から30%程度にまで、配列番号1及び配列番号2に示すタンパク質を可溶性の状態が発現・蓄積させることができる。

このようにして、発現・蓄積されたタンパク質は、発現菌体の無細胞抽出液から、通常のタンパク質精製に用いられるクロマトグラフィーの操作により、均一にまで精製することができる。用いられるクロマトグラフィーとしては、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどが有効であるが、抗体との結合能を有することから、イムノグロブリンを固定化した担体を利用したアフィニティクロマトグラフィーが最も有

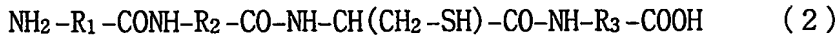
効である。

### 【0043】

#### 3. タンパク質の固定化

本発明では、シアノシステインを介したアミノ基の転移反応を利用してタンパク質のカルボキシ末端のカルボキシル基と、不溶性担体が保持している一級アミノ基との間に、アミド結合を形成させる。

すなわち、本発明においては、一般式 (2)



〔式中、 $\text{R}_1$  は、抗体分子に結合能を有するタンパク質もしくはペプチドのアミノ酸配列、 $\text{R}_2$  は任意のリンカー配列のアミノ酸配列、 $\text{R}_3$  は中性付近で強く負に荷電し、且つ  $\text{NH}_2\text{-R}_1\text{-CONH-R}_2\text{-CO-NH-CH(CH}_2\text{-SH)-CO-NH-R}_3\text{-COOH}$  の等電点を酸性にし得るアミノ酸配列〕

で表される改変抗体結合タンパク質を利用することにより、

一般式 (8)



〔上記式中、 $\text{R}_1$  は、抗体分子に結合能を有するタンパク質もしくはペプチドのアミノ酸配列、 $\text{R}_2$  は任意のリンカー配列のアミノ酸配列〕

で示される、改変抗体結合タンパク質のカルボキシ末端の 1 カ所で不溶性担体に結合させる。そのために、一般式 (2) で示される改変抗体結合タンパク質中のシステイン残基のスルフヒドリル基をシアノ化しシアノシステインに変換する必要がある。この変換は、タンパク質を担体に吸着させる前、タンパク質を担体に吸着させた後、あるいは吸着と同時に行うことができる。

### 【0044】

このシアノ化反応は、市販のシアノ化試薬を用いて行うことができる。シアノ化試薬としては、通常、2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸(2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid (NTCB)) (Y. Degani, A. Ptchornik, Biochemistry, 13, 1-11 (1974) 参照) または、11-シアノ-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロ硼酸(1-cyano-4dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP)) などを用いる方法が簡便である。NTCB を用いたシアノ化は、pH 7.0 の 10mM 磷酸緩衝液中で効率よく行うことができる。このシアノ化反応の後、溶媒を弱アルカリにすることにより、固定化反応が進行する。即ち、シアノシステイン残基直前のアミノ酸残基のカルボキシル基と担体の一級アミンとの間にアミド結合が形成される。このことは、緩衝液を pH 9.5 の 10mM 硼酸緩衝液に換えること等で可能である。

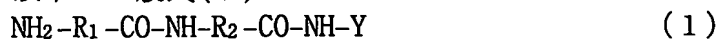
### 【0045】

本発明で用いるシアノシステインが関与する反応には、副反応として加水分解反応などが起こりうるが、上記一般式 (2) で示される改変タンパク質を用いること、すなわち、同式中の  $\text{R}_3$  の導入効果により改変タンパク質の等電点を pH 4 ~ 5 に下げることにより、担体とのイオン相互作用による迅速イオン吸着がおり、固定化反応効率を約 80% 以上に高めることができる。また、シアノシステインを介した固定化反応の副反応である加水分解反応などの副反応から生成する反応物は全て溶媒に溶けるため、反応後、固定化担体を適当な溶媒で洗うことにより副反応生成物を取り除くことができる。

### 【0046】

従って、本発明で用いられる固定化反応により、作製される抗体アフィニティ担体は、抗体分子に結合能を有するタンパク質もしくはペプチドのカルボキシ末端がリンカー配列を介して、1 級アミノ基を有する不溶性担体とアミド結合で固定化されており、これを一般式で表せば、

以下の一般式 (1)



〔上記式中、 $\text{R}_1$  は、抗体分子に結合能を有するタンパク質もしくはペプチドのアミノ酸配列、 $\text{R}_2$  は任意のリンカー配列のアミノ酸配列、 $\text{Y}$  は任意の固定化担体を表す〕

で表され、作製される該担体は、目的とする抗体分子に結合能を有するタンパク質のカルボキシ末端一箇所で配向制御された形で均一に担体に結合している。

## 【0047】

## 4. アフィニティ担体としての利用

上記の操作において得られた、上記一般式(1)で表される抗体分子に結合能を有するタンパク質を固定化したアフィニティ担体は、例えば、抗体の精製分離に用いることができる。

アフィニティ担体に要求される性能として、担体単位重量もしくは体積あたりに結合できるイムノグロブリン量が上げられるが、本発明において得られる一般式(1)で示されるアフィニティ担体においては、固定化された抗体分子に結合能を有するタンパク質もしくはペプチドの機能が完全に保持されるために、担体に導入された抗体分子に結合能を有するタンパク質もしくはペプチドの分子数に依存する。実施例に、示されるように、担体に導入する抗体分子に結合能を有するタンパク質もしくはペプチドの分子数をほぼ最大にすることにより、アフィニティ担体1mlあたり約90mgのイムノグロブリンGを結合・回収することができる。この値は、現在市販されている抗体分離精製用アフィニティ担体のうちで最大の結合量を示すものが、アフィニティ担体1mlあたり約50mgであり、約40mg/mlの結合量の増大を達成できた、本発明のアフィニティ担体が優れていることを示している。

## 【0048】

本発明において得られた、アフィニティ担体は、クロマトグラムメディアとして利用できる。すなわち、抗体であるイムノグロブリンを含む標品を、中性条件下に、本発明のアフィニティ担体をつめたカラム等に導入し、高塩濃度のNaClもしくはKClなどの塩を含む中性の緩衝液で充分洗浄した後に、pH3～5の適切な緩衝液を用いて溶出することで、均一なイムノグロブリンを分離精製することができる。この分離条件は、対象とするイムノグロブリンの性質に依存するが、分離条件を最適化することにより、回収率100%で均一なイムノグロブリンを得ることができる。

## 【0049】

本発明のアフィニティ担体は、作製に用いられる1級アミノ基を有する不溶性担体が熱処理に対して安定性を有すれば、ペプチド結合を切断しない程度の、オートクレーブ、蒸気殺菌などの高温処理により殺菌処理を施すことができ、イムノグロブリン精製プロセス全体の殺菌・洗浄処理の簡便化を達成することが可能であり、医薬品としてのイムノグロブリン製剤の製造過程に好適である。

## 【0050】

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されない。

以下に示す本実施例において用いる不溶性担体としては、日東紡で市販しているL型ポリアリルアミンを市販されている不溶性担体であるCNBr活性化セファロース（ファルマシアより購入）に作用させることにより結合させたもの（これをポリアリルアミン結合セファロースと称する）と市販されているアミノセルロファイン（生化学工業で販売）を用いた。

本実施例において用いる一般式(2)に該当するタンパク質としては、配列表1及び2に示される改変抗体結合タンパク質を用いた。

## 【実施例1】

## 【0051】

ポリアリルアミン結合セファロースの作製

5gのCNBr活性化セファロースを、20mlの1mMの塩酸に懸濁し、30分間膨潤後、50mlの1mMの塩酸で洗浄した。不溶性部分を集め、20mlの0.1% L型ポリアリルアミン溶液に懸濁し、緩やかに12時間混合し、結合反応を行わせた。その後、不溶性部分を20mlの1Mのモノエタノールアミン溶液に懸濁し、4時間、室温で穏やかに攪拌することにより、未反応の担体上の活性基をマスクした。さらに、20mlの1M NaClを含む50mMグリシン/HCl緩衝液（pH3.5）での洗浄と20mlの1M NaClを含む50mMトリス/HCl緩衝液（pH8.0）での洗浄を交互に8回行い、得られた不溶性部分を集め、以降のタンパク質の固定化に用いた。



このようにして得られたポリアリルアミン結合セファロースの導入された一級アミンの含量をトリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS; 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid)を用いた着色反応(R. Fields, Methods in Enzymology, 25, p464-468(1971))で調べたところ、一級アミンを含む担体として市販されているアミノセルロファイン(生化学工業で販売)、AF-アミノトヨパール(TOSOHで販売)、EAH-セファローズ 4 B 及びリジン-セファローズ 4 B (アマシャムファルマシアで販売)、アフィゲル102 (バイオラッドで販売)、ポラス 20NH (ベーリンガーマンハイムで販売)と比較して明らかに強い着色反応を示し、高い一級アミン含量を示した。

### 【実施例 2】

#### 【0052】

#### 改変抗体結合タンパク質の作製

抗体結合タンパク質としては、Staphylococcus aureus由来のプロテイン A の A ドメインのモノマー及びこれを 2 つつなげたダイマーを元に、改変したものをを用いた。モノマー由来及びダイマー由来の改変タンパク質のアミノ酸配列は、それぞれ、配列表 1 及び配列表 2 に示される配列である。

配列表 1 及び配列表 2 に示される改変抗体結合タンパク質を発現できる遺伝子配列として、それぞれ、配列表 8 及び配列表 9 に示す DNA 配列を設計した。設計した配列を元に、断片的に化学合成すると共に PCR 法及び DNA リガーゼを用いた断片結合等を組み合わせることにより、人工合成遺伝子を作製した。人工合成した遺伝子は、末端部分に制限酵素部位として BamHI と EcoRI を導入しており、この部位を利用して発現ベクター pUC18 の BamHI と EcoRI 部位に組み込み、大腸菌 JM109 株に形質導入した。得られた形質変換体から組み換えプラスミドを分離し、BamHI と EcoRI 部位に挟まれた部分の塩基配列を調べ、配列表 8 及び配列表 9 に示す配列が正確に組み込まれた組み換えプラスミドを選択し、それぞれ、PAA2 及び PAAD1 と名付けた。分離した PAA2 及び PAAD1 それぞれを、再度、大腸菌 JM109 株に形質導入し、これを 2 リッターの培地 (20g の塩化ナトリウム、20g の酵母エキス、32g のトリプトン、100mg のアンピシリンナトリウムを含んでいる) で、37℃で一晩培養した後、培養液を 20 分間低速遠心 (毎分 5000 回転) することにより、湿重量約 5g の菌体を得た。

#### 【0053】

これを、40ml の 1mM のエチレンジアミン 4 酢酸 (EDTA) を含む 10mM 磷酸緩衝液 (pH7.0) (緩衝液 1) に懸濁し、フレンチプレスに菌体を破碎した後、20 分間遠心分離し (毎分 20,000 回転)、上清を分離した。得られた上清に、最終濃度が 2% になるようにストレプトマイシン硫酸を加え、4℃で 20 分間攪拌後、20 分間遠心分離し (毎分 20,000 回転)、上清を分離した。得られた上清に、最終濃度が 40% になるよう硫酸アンモニウムを加え、4℃で 20 分間攪拌後、20 分間遠心分離し (毎分 20,000 回転)、上清を分離した。

緩衝液 1 で平衡化した IgG セファローズ 6 ファーストフロー (アマシャムバイオサイエンス社より購入) のカラム (10ml) にアプライし、100ml の緩衝液 1 を流したのち、500ml の 0.5M の KCl を含む緩衝液 1 を流し、溶出液にタンパク質が含まれていないことを確認した後、100ml の蒸留水を流し、塩を除いた。その後、100ml の 0.1M の酢酸で結合している改変抗体結合タンパク質を溶出させた。溶出液を、フラクションコレクターを用いて 2ml ずつ分取し、タンパク質溶出画分として、約 16ml を集めた。その結果、配列表 1 及び配列表 2 に示される改変抗体結合タンパク質として、それぞれ約 10mg 及び約 16mg の精製標品を得ることができた。得られたタンパク質画分を遠心真空乾燥機をもちいて乾燥させることにより、濃縮すると共に酢酸を除去した。このような精製操作を施しても、抗体結合能は完全に保たれていた。得られた乾燥標品を適当な緩衝液に溶解し、固定化反応に用いた。

### 【実施例 3】

#### 【0054】

#### タンパク質の固定化

実施例 3 において得られた配列表 1 及び配列表 2 で示される抗体結合タンパク質の乾燥標

品を、1mg/mlとなるように5mMのエチレンジアミン4酢酸(EDTA)を含む10mM磷酸緩衝液(pH7.0)(緩衝液2)に溶解したものをまず作製し、これを緩衝液2で適宜希釈することにより各種濃度のタンパク質標品を調製した。

各種濃度に調製に調節した配列表1及び配列表2で示される抗体結合タンパク質標品990 $\mu$ lと実施例1において作製したポリアリルアミン結合セファロース10 $\mu$ lとを混合し、2時間以上室温で穏やかに攪拌混合した後、1000回転で数秒間遠心し、不溶性部分を集めた(ステップ1)。不溶性部分を、5mMの2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸(NTCB)を含む緩衝液2に懸濁し、穏やかに攪拌混合しながら室温で4時間シアノ化反応を行わせた(ステップ2)。その後、1mlの緩衝液2で5回洗浄した。得られた不溶性部分を1mlの、5mMのEDTAを含む10mM硼酸緩衝液(pH9.5)に懸濁し、穏やかに攪拌混合しながら室温で24時間固定化反応を行った(ステップ3)。その後、不溶性部分を、1mlの1MKCLを含む10mM磷酸緩衝液(pH7.0)で5回洗浄し、未反応物及び固定化反応の副反応生成物を除去した(ステップ)。

#### 【0055】

ポリアリルアミン結合セファロースに固定化されたタンパク質量は、固定化反応における各段階に用いられた溶液についてタンパク質量を求め、反応に相タンパク質量から、溶液として回収された部分に含まれるタンパク質量を差し引き、求めた。固定化されるタンパク質量は、加えるタンパク質量を増加させると共に増加し、ステップ1において静電相互作用による吸着が最大となるとときに最大固定化量を示し、配列表1及び配列表2で示される抗体結合タンパク質とも、10 $\mu$ lのポリアリルアミン結合セファロースあたり、約11nモルのタンパク質が固定化された。

なお、配列表1及び配列表2で示される抗体結合タンパク質標品のタンパク質濃度は、224nmと233.3nmにおける吸光度を測定することにより求めた(W. E. Groves, et al., Anal. Biochem., 22, 195-210 (1968))。

#### 【実施例4】

#### 【0056】

抗体結合タンパク質標品のタンパク質を固定化した担体のイムノグロブリンG結合力の測定

実施例3で作製された、抗体結合タンパク質標品のタンパク質を固定化した担体の抗体分子結合能を以下のようにして測定した。

配列表1及び配列表2で示される抗体結合タンパク質を固定化した担体10 $\mu$ lと990 $\mu$ lのヒト由来のイムノグロブリンG(2mg)とをpH7.0の10mM磷酸緩衝液中で混合し、12時間室温で穏やかに攪拌した後、1mlの1MKCLを含むpH7.0の10mM磷酸緩衝液で5回洗浄した。280nmの吸光度を測定することにより、最後の洗浄液にタンパク質が含まれないことを確認した。

担体からの、イムノグロブリンGの遊離は、洗浄後遠心分離により集めた不溶性担体に、0.1M酢酸溶液1mlを加えることにより行った。溶液中に遊離されたイムノグロブリンGの量を、280nmの吸光度を測定し、その吸光度係数( $E_{280}^{1\%}=14.0$ )から決定した。その結果、配列表1及び配列表2で示される抗体結合タンパク質を固定化した担体それぞれにおいて、それぞれ、430 $\mu$ g及び890 $\mu$ gが遊離された。

#### 【0057】

比較のために市販されているプロテインAを固定化したアフィニティ担体野中で、最も高い抗体結合能を示すものを2種類購入し、上記の方法で、固定化・遊離されるイムノグロブリンGを測定したところ表1に示す結果が得られた。

【表 1】

抗体結合タンパク質を固定化したアフィニティ担体を示すヒトイムノグロブリンの結合能力の比較

固定化担体	固定化・遊離できたイムノグロブリン Gのタンパク質量(mg/ml担体)
配列表 1 で示される抗体結合タンパク質を固定化した担体	約 63
配列表 2 で示される抗体結合タンパク質を固定化した担体	約 89
市販品 1	約 46 (50*)
市販品 2	約 31 (35*)

\* の値は、市販の抗体吸着用担体のカタログに書かれている抗体吸着容量を示す。

本発明の固定化担体のうち配列表 2 で示される抗体結合タンパク質を固定化した担体は、市販の抗体吸着用担体の中で最も吸着能力の高い担体（50mg/ml担体）の約2倍であり、本発明が優れていることを実証している。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> The support having affinity to antibody

<130> 341-02845

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 70

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Protein for  
antibody immobilization

<400> 1

Ala	Asp	Asn	Asn	Phe	Asn	Lys	Glu	Gln	Gln	Asn	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile
1				5					10					15	

Leu	Asn	Met	Pro	Asn	Leu	Asn	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Gly	Phe	Ile	Gln
			20					25					30		

Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ala	Asn	Leu	Leu	Ala	Glu	Ala
		35					40					45			

Lys	Lys	Leu	Asn	Glu	Ser	Gln	Ala	Pro	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Cys	Ala
	50					55					60				

Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
65					70

<210> 2

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Protein for  
antibody immobilization

&lt;400&gt; 2

Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Asn Phe Asn  
50 55 60

Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu  
65 70 75 80

Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro  
85 90 95

Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser  
100 105 110

Gln Ala Pro Lys Gly Gly Gly Gly Cys Ala Asp Asp Asp Asp Asp Asp  
115 120 125

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 128

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Protein for  
antibody immobilization

&lt;400&gt; 3

Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Asn Phe Asn

50                                  55                                  60  
 Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu  
 65                                  70                                  75                                  80  
 Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro  
                                 85                                  90                                  95  
 Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser  
                                 100                                  105                                  110  
 Gln Ala Pro Lys Gly Gly Gly Gly Cys Ala Asp Asp Asp Asp Asp Asp  
                                 115                                  120                                  125

<210> 4  
 <211> 128  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:Protein for  
                                 antibody immobilization

<400> 4  
 Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
   1                                  5                                  10                                  15  
 Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
                                 20                                  25                                  30  
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala  
                                 35                                  40                                  45  
 Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Asn Phe Asn  
                                 50                                  55                                  60  
 Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu  
   65                                  70                                  75                                  80  
 Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro  
                                 85                                  90                                  95  
 Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser  
                                 100                                  105                                  110  
 Gln Ala Pro Lys Gly Gly Gly Gly Cys Ala Asp Asp Asp Asp Asp Asp

115

120

125

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Linker peptide

&lt;400&gt; 5

Gly	Gly	Gly	Gly	Cys	Ala	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
1				5					10		

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 216

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:DNA coding  
protein for antibody immobilization

&lt;400&gt; 6

atggctgata	acaatttcaa	caaagaacaa	caaatgctt	tctatgaaat	cttgaatatg	60
cctaacttaa	acgaagaaca	acgcaatggt	tcatccaaa	gcttaaaaga	tgaccaagc	120
caaagtgcta	acctattgtc	agaagctaaa	aagttaaag	aatctcaagc	accgaaaggt	180
ggcggtaggt	gcgctgatga	cgatgacgat	gactaa			216

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 390

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:DNA coding  
protein for antibody immobilization

&lt;400&gt; 7

atggctgata	acaatttcaa	caaagaacaa	caaatgctt	tctatgaaat	cttgaatatg	60
cctaacttaa	acgaagaaca	acgcaatggt	tcatccaaa	gcttaaaaga	tgaccaagc	120
caaagtgcta	acctattgtc	agaagctaaa	aagttaaag	aatctcaagc	accgaaagct	180
gataacaatt	tcaacaaaga	acaacaaaat	gctttctatg	aatcttgaa	tatgcctaac	240
ttaaacgaag	aacaacgcaa	tggtttcatc	caaagcttaa	aagatgaccc	aagccaaagt	300

gctaacctat tgtcagaagc taaaaagtta aatgaatctc aagcaccgaa aggtggcggt 360  
ggctgcgctg atgacgatga cgatgactaa 390

<210> 8  
<211> 302  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:DNA coding  
protein for antibody immobilization

<400> 8  
ggatccttga caatatctta actatctggt ataatatatt gaccagggtta actaactaag 60  
cagcaaaaagg aggaacgact atggctgata acaatttcaa caaagaacaa caaatgctt 120  
tctatgaaat cttgaatatg cctaacttaa acgaagaaca acgcaatggt ttcattccaa 180  
gcttaaaaga tgacccaagc caaagtgcta acctattgtc agaagctaaa aagttaaagt 240  
aatctcaagc accgaaagggt ggcgggtggct gcgctgatga cgatgacgat gactaagaat 300  
tc 302

<210> 9  
<211> 476  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:DNA coding  
protein for antibody immobilization

<400> 9  
ggatccttga caatatctta actatctggt ataatatatt gaccagggtta actaactaag 60  
cagcaaaaagg aggaacgact atggctgata acaatttcaa caaagaacaa caaatgctt 120  
tctatgaaat cttgaatatg cctaacttaa acgaagaaca acgcaatggt ttcattccaa 180  
gcttaaaaga tgacccaagc caaagtgcta acctattgtc agaagctaaa aagttaaagt 240  
aatctcaagc accgaaagct gataacaatt tcaacaaaga acaacaaaat gctttctatg 300  
aaatcttgaa tatgcctaac ttaaaccgaag aacaacgcaa tggtttcatc caaagcttaa 360  
aagatgaccc aagccaaagt gctaacctat tgtcagaagc taaaaagtta aatgaatctc 420  
aagcaccgaa aggtggcggt ggctgcgctg atgacgatga cgatgactaa gaattc 476

<210> 10  
<211> 74  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Additional DNA  
sequence for gene expression



<400> 10

ttgacaatat cttaactatc tgttataata tattgaccag gttaactaac taagcagcaa 60  
aaggaggaac gact 74

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

抗体分子に対して高い吸着能力を有する不溶性の担体を提供する。

【課題解決手段】

抗体分子に結合能を有するタンパク質もしくはペプチドのカルボキシ末端がリンカー配列を介して、1級アミノ基を有する不溶性担体とアミド結合で固定化されていることを特徴とする抗体アフィニティ担体。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 3 5 2 9 3 7
受付番号	5 0 3 0 1 6 9 6 7 7 9
書類名	特許願
担当官	第三担当上席 0 0 9 2
作成日	平成 1 5 年 1 0 月 1 4 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成15年10月10日

特願 2 0 0 3 - 3 5 2 9 3 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 0 1 0 2 1 5 3 3 ]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 4 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**